

【要約】

KDM2B in polycomb repressive complex 1.1 functions

as a tumor suppressor in T cell leukemogenesis

(KDM2B および PRC1.1 による T 細胞性急性リンパ性白血病発症

抑制機序の解明)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：横手 幸太郎 教授)

一色 佑介

緒言

ポリコーム群複合体 (PRC) はヒストン修飾を介して標的遺伝子発現を負に制御するタンパク複合体であり、その機能から大きく PRC 1 と PRC2 に分類される。PRC1 はヒストン H2A を構成するアミノ酸のうち、119 番目のリジンをモノユビキチン化 (H2AK119ub1) し、PRC2 はヒストン H3 の 27 番目のリジンをトリメチル化 (H3K27me3) する。通常 PRC1 は PRC2 が付加する H3K27me3 により誘導されるが、近年 H3K27me3 非依存的に H2AK119ub1 を付加し、その後に PRC2 を誘導する PRC1 の variant (non-canonical PRC1) が同定され、その機能解析が行われている。

KDM2B は BCOR、PCGF1、RING1B などとともに non-canonical PRC1 の 1 つである PRC1.1 を構成するタンパクであり、PRC1.1 の標的遺伝子へのリクルートに重要な役割を担っている。KDM2B の有する CxxC ドメインは標的遺伝子のプロモーター領域に存在する非メチル化 CpG island に特異的に結合し、これを介して他の PRC1.1 構成タンパクがリクルートされる。CxxC ドメインを欠損させたマウスにおいては、PRC1.1 が標的遺伝子へリクルートされなくなることから、CxxC ドメインが KDM2B のリクルート機能において中心的な役割を担っていると考えられている。

PRC 構成因子をコードする遺伝子の変異は、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-

ALL)において高頻度に報告されている。特に PRC2 を構成する *EZH2*、*SUZ12*、*EED* 遺伝子の機能喪失型変異が高頻度に検出されており、実際に T-ALL における PRC2 のがん抑制機能はすでに複数報告されている。一方、KDM2B と同様に PRC1.1 を構成する BCOR 遺伝子の機能喪失型変異も数%程度で認められることから、PRC1.1 も PRC2 同様がん抑制的な機能を持つことが推定されているが、詳細なメカニズム解析は未だなされていない。

先行研究において、我々は *Bcor* コンディショナルノックアウト (KO) マウスが、NOTCH1 活性化を伴って、高率に T-ALL を発症することを明らかにしたが、詳細なメカニズム解析は行われておらず、BCOR 機能不全がどのような機序で T-ALL 発症につながるのかについては未だ明らかでない。

目的

PRC1.1 が T-ALL においてがん抑制的な機能を有するという仮説をもとに、CxxC ドメインを欠損させた *Kdm2b* Δ CxxC マウスを用いて PRC1.1 機能不全を誘導し、詳細な遺伝子発現解析およびヒストン修飾解析を行うことで、PRC1.1 による T-ALL 発症抑制メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とする。

方法

Kdm2b^{fl/fl}; Cre-ERT マウスを作成し、9.5Gy の放射線照射を行ったレシピエントマウスに *Kdm2b^{fl/fl}; Cre-ERT* マウスの骨髄細胞を移植した。生着を確認後タモキシフェンを投与することで、Cre 組換え酵素の活性を誘導し、血液細胞特異的に *Kdm2b* の CxxC ドメインを欠損する *Kdm2b ΔCxxC* マウスを作成した。このマウスを長期観察し、T-ALL 発症の有無および前述の詳細なメカニズム解析を行った。

結果

タモキシフェン投与後 300 日の観察期間中、*Kdm2b ΔCxxC* マウスのほとんどが死亡した。FACS 解析によりその死因の多くは T-ALL であり、特に CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) 細胞の形質を示すものが多く認められた。DP T-ALL 細胞、T-ALL を発症していない *Kdm2b ΔCxxC* および野生型マウス由来の胸腺 DP 細胞を用いた RNA シークエンスにより、T-ALL 細胞では、細胞増殖に重要な働きを有する *Myc* とその下流の遺伝子群の発現が優位に亢進していることが明らかとなった。T 細胞においては NOTCH1 が *Myc* の重要な regulator であることから、NOTCH1 の標的遺伝子の遺伝子発現を確認したところ、WT と比較して T-ALL で発現が亢進していることが確認された。これら

の結果は T-ALL 細胞における NOTCH1 活性化を示唆する所見であり、実際、T-ALL 細胞における *Notch1* 遺伝子の機能亢進型変異が半数以上のマウスで確認された。同様の結果は BCOR 機能不全マウスでも確認されていることから、PRC1.1 機能不全マウスにおいては NOTCH1 の活性化が誘導されることで、T-ALL が発症することが明らかとなった。

次に、KDM2B および PRC1.1 の胸腺 DP 細胞における標的遺伝子を同定するため、KDM2B を強制発現させた胸腺 DP 細胞を用いて ChIP シークエンスを行った。Peak call 解析の結果から、KDM2B の結合ピークは主に標的遺伝子のプロモーター付近の転写開始点 (TSS; transcript start sites) に存在していることが明らかとなり、さらに TSS 領域における H2AK119ub1 および H3K27me3 のヒストン修飾状態を評価することで、KDM2B が結合し、かつ H2AK119ub1 および H3K27me3 修飾が認められる、KDM2B 標的遺伝子を同定することに成功した。次にこの KDM2B 標的遺伝子における H2AK119ub1 を、DP T-ALL 細胞、T-ALL を発症していない *Kdm2b* Δ *CxxC* および野生型マウス由来の胸腺 DP 細胞を用いて比較したところ、T-ALL 細胞では、野生型と比較して TSS 領域における H2AK119ub1 が有意に低下していた。*Kdm2b* Δ *CxxC* マウス由来の胸腺 DP 細胞では H2AK119ub1 の有意な低下は見られなかったものの、*Myc* を含む NOTCH1 標的遺伝子の TSS 領域における H2AK119ub1 は T-ALL 細胞で明ら

かに低下し、*Kdm2b* Δ *CxxC* マウス由来の胸腺 DP 細胞でも同様に低下する傾向が見られた。これらの結果から、KDM2B 機能不全マウスにおいては、NOTCH1 標的遺伝子のプロモーター領域における H2AK119ub1 レベルが低下することで、H2AK119ub1 による遺伝子発現抑制が解除された結果、発現上昇をきたしているものと考えられた。

上記の解析結果は、胸腺 DP 細胞において、定常状態では PRC1.1 が NOTCH1 標的遺伝子の発現を抑制的に制御していることを強く示唆しており、PRC1.1 と NOTCH1 の関係性をさらに詳しく理解するため、KDM2B ChIP シークエンスデータを DP 細胞を用いた BCOR および NOTCH1 ChIP シークエンスの結果と比較した。TSS 付近における KDM2B、BCOR、NOTCH1 の結合ピークは有意に overlap しており、胸腺 DP 細胞においては、PRC1.1 と NOTCH1 が多くの遺伝子の TSS 領域で共存していることが明らかとなった。さらに PRC2 構成因子の EZH2 結合ピークも同様に overlap が認められたことから、PRC1.1 と PRC2 が協調して NOTCH1 標的遺伝子発現を抑制していることが明らかとなった。KDM2B、EZH2、NOTCH1 が胸腺 DP 細胞の TSS 領域で共存している 1276 遺伝子の特徴を明らかにするために KEGG pathway 解析を行ったところ、NOTCH1 signaling pathway のほか、T cell receptor signal や cell cycle など、T-ALL 細胞の増殖・維持に重要な役割を担う遺伝子が含まれていることが明らか

となった。

結語

本研究により、胸腺 DP 細胞においては PRC1.1 と PRC2 が協調して NOTCH1 標的遺伝子の発現を抑制的に制御していること、PRC1.1 の機能不全が NOTCH1 標的遺伝子の過剰な転写活性化を引き起こしていることが明らかになった。ここに NOTCH1 遺伝子変異など NOTCH1 の活性を強く増強する因子が加わることで、*Myc* に代表される NOTCH1 標的遺伝子発現が著しく活性化され、T-ALL 発症をきたしているものと考えられた。